

CUANTIFICACIÓN DE *Streptococcus bovis* Y *Megasphaera elsdenii* EN LÍQUIDO RUMINAL DE VACA Y TERNERA MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR A TIEMPO REAL

Blanch, M.¹, Calsamiglia, S.¹, Castelló, A.²

¹Grup de Recerca en Nutrició, Maneig i Benestar Animal. ²Servei Veterinari de Genètica Molecular. Dept de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra. (* martabs80@hotmail.com)

INTRODUCCIÓN

La acidosis ruminal es uno de los desórdenes nutricionales más comunes en vacuno lechero y de engorde. Los sistemas productivos actuales en nuestro país tienden cada vez más a la intensificación. El incremento en la proporción de carbohidratos rápidamente fermentables en la dieta se traduce en una acumulación de ácidos grasos volátiles y lactato, incrementando el riesgo de acidosis. En España, la acidosis es la segunda afección más frecuente en cebaderos industriales (Bermúdez, 2002). El impacto económico asociado a la acidosis es importante, y se ha estimado que en el sector norteamericano se sitúa alrededor de 500-1000 millones de US dólares anualmente (Stone, 1999). Las bacterias productoras (*Streptococcus bovis*) y utilizadoras (*Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*) de lactato juegan un papel importante en el desarrollo de la acidosis. El desarrollo de técnicas para cuantificar estas bacterias podría ser una herramienta de gran utilidad para el estudio de la acidosis ruminal. La PCR a tiempo real (qRT-PCR) es un método que permite cuantificar microorganismos. Este trabajo trata del desarrollo y aplicación de la qRT-PCR para detectar y cuantificar dos bacterias ruminales asociadas con la acidosis (*S. bovis* y *M. elsdenii*).

MATERIAL Y MÉTODOS

En la primera fase, se puso a punto la técnica de qRT-PCR. Se utilizaron los cultivos puros de *S. bovis* (DSM 20480) y de *M. elsdenii* (DSM 20460). Para la extracción de DNA de los cultivos puros se siguió el protocolo de Whitford *et al.* (1998) con algunas modificaciones. El DNA se cuantificó mediante espectrofotometría (NanoDrop®ND-1000). Los oligonucleótidos específicos para amplificar *S. bovis*, como también las sondas Taqman para *S. bovis* y *M. elsdenii*, fueron diseñados a partir de la secuencia del 16S DNA ribosomal usando el software Primer Express™. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar *M. elsdenii* fueron los diseñados por Ouwerkerk *et al.* (2002). En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y de las sondas Taqman utilizadas. Las condiciones de la qRT-PCR fueron las siguientes: 20 µL de volumen de reacción final, con 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), oligonucleótidos a una concentración final de 900 nM cada uno, sonda Taqman a 250 nM, y 100 ng de DNA genómico (5 µL a 20 ng/µL). Se utilizó el aparato ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) para correr las qRT-PCR usando placas de 96 pozos y con los siguientes parámetros de amplificación: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, y 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C.

Tabla1. Oligonucleótidos y sondas Taqman para la detección de *S. bovis* y *M. elsdenii*.

	Oligo. Forward	Oligo. Reverse	Sonda Taqman-MGB	Tño frag. (pb)
<i>S. bovis</i>	S. bovis F: 5'-GAT AGC TAA TAC CGC ATA ACA GCA TT-3'	S. bovis R: 5'-AAC GCA GGT CCA TCT ACT AGT GAA-3'	5'-TGC TCC TTT CAA GCA T-3'	84
<i>M. elsdenii</i>	MelsF: 5'-GAC CGA AAC TGC GAT GCT AGA-3'	MelsR: 5'-CGC CTC AGC GTC AGT TGT C-3'	5'-ACT GGT GTT CCT CCT AAT A-3'	129

En la segunda fase, se realizó un estudio comparativo de las poblaciones de *S. bovis* y *M. elsdenii* mediante la qRT-PCR entre vacas y terneras. Se utilizaron 4 vacas lecheras canuladas (696 ± 94 kg) y cuatro terneras de engorde canuladas (221 ± 17 kg). La dieta de las vacas consistía en TMR *ad libitum* (15.6% PB y 35.4% FND, en base a MS) y 3 kg de concentrado (25.8% PB, 21.7% FND y 2.9% EE, en base a MS). A las terneras se les administró una dieta 10:90 paja de trigo:concentrado (15.7% PB y 22.3% FND, en base a MS). Durante 5 días consecutivos, se tomaron muestras de líquido ruminal a las 0, 4, 8 y 12 h post-alimentación. El pH ruminal se midió inmediatamente mediante un pHmetro portátil (Crison®). Se filtró el líquido ruminal con doble capa de gasa, se tomaron submuestras del filtrado en eppendorfs estériles, y se congelaron a -20°C hasta el análisis de qRT-PCR.

Los resultados del estudio comparativo entre vacas y terneras se analizaron usando el PROC MIXED del SAS (versión 8.2) para medidas repetidas. El modelo contenía el grupo (vaca o ternera), la hora, el día, y las interacciones grupo*hora y grupo*día.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especificidad de los oligonucleótidos y las sondas diseñadas en este estudio para detectar *S. bovis* y *M. elsdenii* se comprobó usando cultivos puros de las bacterias en estudio como también cultivos puros de otras bacterias ruminales como controles negativos en la qRT-PCR (*Clostridium aminophilum* DSM 10710, *Clostridium sticklandii* DSM 519, *Peptostreptococcus anaerobius* DSM 2949, *Butyrivibrio fibrisolvens* DSM 3071, *Ruminococcus albus* DSM 20455, *Anaerovibrio lipolyticus* DSM 3074 y *Lactobacillus acidophilus* CECT 903NT). Los resultados confirmaron la especificidad (no se muestran los datos).

Las curvas patrón de cada bacteria sirven para determinar la eficiencia de la qRT-PCR. Las curvas de *S. bovis* y *M. elsdenii* tuvieron unas pendientes de -3.636 y -3.333 respectivamente, lo que corresponde a unas eficiencias del 88% y 99%, según los cálculos de Ginzinger (2002), además de unos $R^2=0.999$. La sonda Taqman diseñada para *M. elsdenii* mejoró la eficiencia observada por Ouwerkerk *et al.* (2002).

La cuantificación de *S. bovis* y *M. elsdenii* en vacas y terneras se muestra en la Tabla 2. La cantidad de *S. bovis* fue 145 veces mayor en vacas que en terneras. Estos resultados concuerdan con Krause *et al.* (2003), que observaron que *S. bovis* era la especie dominante en animales alimentados a base de forraje comparado con animales alimentados a base de concentrado (90% y 40% del total de bacterias, respectivamente). Al contrario, Goad *et al.* (1998) observaron recuentos superiores de *S. bovis* en terneros alimentados a base de concentrado que los alimentados a base de forraje. En principio, se puede pensar que los recuentos de *S. bovis* tengan que ser superiores en dietas altas en concentrado, debido a su actividad amilolítica, pero eso sólo se ha observado en los periodos de transición, y una vez los animales ya están adaptados a una dieta concentrada los recuentos de *S. bovis* disminuyen y los de lactobacilos aumentan (Tajima *et al.*, 2001). La cantidad de *M. elsdenii* fue 13 veces inferior en vacas que en terneras, aunque las diferencias no fueran significativas debido al alto error estándar. Estos resultados coinciden con Goad *et al.* (1998) y Krause *et al.* (2003) que también observaron mayores recuentos de bacterias utilizadoras de lactato (*M. elsdenii*) en animales con una dieta alta en concentrado que en una dieta alta en forraje. Además, Ouwerkerk *et al.* (2002) no detectaron *M. elsdenii* mediante qRT-PCR en el contenido ruminal de terneros alimentados a base de pastos.

La ratio *S. bovis*:*M. elsdenii* fue 49 veces superior en vacas que en terneras. En este estudio, se planteó la hipótesis que esta ratio podía servir como índice para evaluar el riesgo de acidosis, debido a que relaciona los productores y los utilizadores de lactato, permitiendo más o menos acumulación de éste. Así, cuanto más alta es la ratio mayor es el riesgo de acidosis. Nuestros resultados no sugieren que esta ratio sea un buen índice para evaluar el

riesgo de acidosis, porque a pesar de observar diferentes ratios en vacas que en terneras, su pH fue similar (6.26 ± 0.305).

Tabla 2. Cuantificación de *S. bovis*, *M. elsdenii* y ratio *S. bovis*:*M. elsdenii* en vacas (n=20) y terneras (n=20).

	Terneras	Vacas	SEM ¹	P-valor
<i>M. elsdenii</i> , pg/100 ng DNA total				
0	60.9	4.08	27.7	NS
4	48.2	4.59	27.7	NS
8	44.1	3.76	27.7	NS
12	57.5	3.72	27.7	NS
Media	52.7	4.04	25.4	NS
EEM	39.1	0.618		
P-valor	NS	NS		
<i>S. bovis</i> , pg/100 ng DNA total				
0	1.31	373.5	27.9	< 0.01
4	1.22	318.0	27.9	< 0.01
8	1.07	230.8	27.9	< 0.01
12	4.27	216.4	27.9	< 0.01
Media	1.97	284.7	21.7	< 0.01
EEM	2.26	39.4		
P-valor	NS	< 0.05		
<i>S. bovis</i> : <i>M. elsdenii</i> ratio				
0	0.43	86.0	8.74	< 0.01
4	1.84	74.7	8.74	< 0.01
8	1.14	58.7	8.74	< 0.01
12	1.89	54.3	8.74	< 0.01
Media	1.33	68.4	7.66	< 0.01
EEM	0.830	12.3		
P-valor	NS	< 0.05		

EEM= Error Estándar de la Media.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bermúdez, J.H. 2002. Congreso de la Sociedad Española Medicina Interna Veterinaria, 2002:96-102.
- Ginzinger, D.G. 2002. *Experimental Hematology*. 30:503-512.
- Goad, D.W., Goad, C.L., Nagaraja, T.G. 1998. *J. Anim. Sci.* 76:234-241.
- Krause, D.O., Smith, W.J.M., Conlan, L.L., Gough, J.M., Williamson, M.A., McSweeney, C.S. 2003. *Microbiology*. 149:57-65.
- Ouwerkerk, D., Klieve, A.V., Forster, R.J. 2002. *J. Appl. Microbiol.* 92:753-758.
- Stone, W.C. 1999. *Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf. Cornell Univ.*, pages: 40-46.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y. 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2766-2774.
- Whitford, M.F., Forster, R.J., Beard, C.E., Gong, J., Teather, R.M. 1998. *Anaerobe* 4:153-163.